

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND

MARKENAMT

Offenlegungsschrift

⑯ DE 197 42 725 A 1

⑯ Aktenzeichen: 197 42 725.1

⑯ Anmeldetag: 26. 9. 97

⑯ Offenlegungstag: 1. 4. 99

⑯ Int. Cl. 6:

C 12 N 15/11

C 07 H 21/04

C 12 N 15/63

C 07 K 14/81

C 12 N 5/10

C 12 N 1/00

C 07 K 16/00

A 01 K 67/00

⑯ Anmelder:

Abts, Harry Frank, Dr., 50937 Köln, DE

⑯ Erfinder:

Abts, Harry Frank, Dr.rer.nat., 40225 Düsseldorf, DE;
Michel, Günter, Dr.rer.nat., 40225 Düsseldorf, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

US 54 70 970 A

EP 02 83 932 A2

WO 964 09 22a A1

WO 96 34 957 A1

MUELLER,Chris G.E.,et.al.: Polymerase chain reaction-based identification of a novel serpin from human dendritic cells. In: Eur. J. Immunol. 1997, 27, S.3130-3134;
MEDLINE, Ref. 97422609, Genomics, 1997, Aug.1, 43, (3), S.321-328;
MEDLINE, Ref. 97326124, Journal Of Biological Chemistry, 1997 Jun 13, 272, (24), S.15434-15441;
MEDLINE, Ref. 1998099674, Molecular Vision, 1996, Nov. 4, 2, S.11;
MEDLINE, Ref. 96102039, Journal Of Biological Chemistry, 1995, Dec. 15, 270, (50), S.29854- S.29861;
MEDLINE, Ref. 96070759, Journal Of Biological Chemistry, 1995, Nov. 10, 270, (45), S.26754- S.26757;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

⑯ Hurpin/PI13: Ein neuer, UV-reprimierbarer, Serin Protease Inhibitor aus der Familie der Ovalbumin-Serpine

⑯ Die Erfindung umfaßt die Identifizierung und Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenzen eines neuen Serin Protease Inhibitors aus der Familie der Ovalbumin-Serpine sowie seine Einordnung in den Kontext der UVB-Antwort humaner Keratinozyten und der pathophysiologischen Genexpression bei der Psoriasis (Schuppenflechte).

DE 197 42 725 A 1

Beschreibung

5 Störungen der IIomöosthase in der IIaut finden sich bei bei malignen IIauttumoren wie dem Basaliom oder dem Plattenepithelkarzinom, aber auch bei benignen proliferativen Hauterkrankungen wie der Schuppenflechte (Psoriasis). Auf Expressionsebene dokumentiert sich dieser abnorme Phänotyp der beteiligten Keratinozyten durch eine veränderte Genexpression im Vergleich mit Keratinozyten in gesunder Haut.

10 Einen direkten Einfluß auf die Genexpression in der Haut hat auch die ultraviolette (UV) Komponente des Sonnenlichts. Insbesondere das mittlere Spektrum der UV-Strahlung (UVA, 280–210 nm) ist verantwortlich für diesen Effekt in Keratinozyten. Neben akuten Effekten wie Sonnenbrand und Immunsuppression können als Langzeiteffekte Hauttumore 15 entstehen. Die Verbindung zwischen UV-Strahlung und deregulierter Genexpression bei Hauterkrankungen läßt vermuten, daß Gene, die an der physiologischen UV-Antwort beteiligt sind, ebenfalls bei pathologischen Prozessen in der Haut von Bedeutung sind.

15 Die molekularen Vorgänge bei der physiologischen UV-Antwort und der UV-Karzinogenese sind nur unvollständig aufgeklärt und erst wenige Gene konnten in diesem Kontext identifiziert werden.

20 15 Bedingt durch die methodischen Ansätze wurde bisher der reprimierende Effekt auf die Genexpression der UV-Strahlung nicht systematisch erfaßt (1–3).

25 Durch die Anwendung der differentiellen mRNA Display Polymerase Kettenreaktion (DD-PCR) (4) boten sich hier neue Möglichkeiten zur Identifizierung und Klonierung UV-regulierter Gene. Ähnlich wie die subtraktive cDNA-Hybridisierung ist keine Kenntnis über die Sequenz der zu isolierenden Gene notwendig. Einzig ein quantitativer Unterschied der relevanten Sequenzen in den zu vergleichenden Zellpopulationen ist für die Identifizierung erforderlich. Dies ermöglicht die gleichzeitige Erfassung von bekannten und unbekannten Genen. Im Unterschied zur subtraktiven cDNA-Hybridisierung ist bei der DD-PCR die vergleichende Analyse nicht auf 2 Zellpopulationen beschränkt, sondern es können so viele Populationen nebeneinander analysiert werden, wie gleichzeitig gehandhabt werden können. Da zudem auch quantitative Unterschiede dargestellt werden können, ermöglicht dies die Erfassung der Expressionskinetik UV-regulierter Gene. Dabei können im Unterschied zu anderen Methoden zur gleichen Zeit sowohl UV-induzierte als auch UV-reprimierte Gene erfaßt werden.

30 25 Die Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) beinhaltet hochmolekulare (40–60 kDa) Proteine mit einer einzigen Aminosäurekette, die durch eine hoch geordnete Tertiärstruktur charakterisiert ist. Definiert wird diese Tertiärstruktur durch α 1-Antitrypsin (α 1-PI) (5), dem Prototyp aller Serpines. Die aus 9 α -Helices und 3 β -Faltblättern bestehende Tertiärstruktur mit spezifischen Faltungseigenschaften ist elementar für die Funktion der Proteaseinhibitoren. Die inhibitorische Spezifität wird dabei in erster Linie durch die Aminosäurereste in P1-P1' Position im reaktiven Zentrum nahe des C-Terminus des Proteins bestimmt. Dieser metastabile Teil des Proteins macht infolge einer Interaktion mit dem reaktiven Zentrum einer Zielprotease eine Konformationsänderung durch und bildet schließlich einen kovalenten Serpin-Proteinase-Komplex (6).

35 30 Durch Aminosäurevergleiche, charakteristische Eigenschaften der Proteine und Genomorganisation konnte innerhalb der großen Serpinfamilie die Ovalbumin-Familie (Ov-Serpine) von intrazellulären Serpines identifiziert werden (7).

35 35 Serpines sind an einer Vielzahl von wichtigen Proteinase-vermittelten physiologischen Funktionen wie Blutgerinnung, Fibrinolyse, Entzündung, Zellmigration, Umbau extrazellulärer Matrix (8) sowie Aktivierung von Interleukin-Vorläufern (9) beteiligt.

40 Eine wachsende Zahl neuer Daten zeigt eine Beteiligung von Serpines bei der Regulation von Proteinasen, die an Schlüsselstellen apoptotischer Vorgänge stehen (10–13). In humanen Keratinozyten sind Serpines, wie für PAI-1 gezeigt (14), bei der Migration und Differenzierung von Zellen sowie im Kontext der Wundheilung von Bedeutung. Für PAI-2 konnte in Keratinozyten eine Beteiligung an intrazellulären Prozessen, die mit der terminalen Differenzierung und Bildung der verhornten Zellwand ("cornified envelope") in Zusammenhang stehen, demonstriert werden (15).

45 40 Die vorliegende Anmeldung beschreibt die Identifizierung, Aufklärung und Analyse der vollständigen cDNA-Sequenzen eines neuen Serin-Protease-Inhibitors sowie seine Zuordnung zur Familie der Ovalbumin-Serpine. Das neue Serpin ist in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT als UVB-reprimierbare Sequenz isoliert worden und wurde daher als "hurpin" für HaCaT UV repressible serpin bezeichnet. Das Genom Data Base nomenclature committee hat für hurpin die systematischen Bezeichnung proteinase inhibitor 13 (PI13) reserviert (confidential). Untersuchungen zur Expression zeigen, daß hurpin spezifisch in Keratinozyten exprimiert wird. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf eine Verknüpfung von hurpin mit der Proliferation und Aktivierung von humanen Keratinozyten hin. Weiterhin zeigt sich bei der Psoriasis eine deutliche Überexpression von hurpin in befallener Haut im Vergleich mit unbefallener Haut.

50 45 Eine mögliche Funktion von hurpin in diesem Zusammenhang könnte die Verhinderung von apoptotischen Vorgängen in Keratinozyten sein.

55 50 Die Identifizierung eines neuen UV-reprimierbaren Serin-Protease-Inhibitors und die Assoziation mit einer benignen, proliferativen Hauterkrankung (Psoriasis) bietet Ansatzpunkte für:

- 60 55 – die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Erkrankung.
- die Etablierung neuer klinischer Parameter zur Verlaufskontrolle.
- die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

Nachstehend werden die im Verlauf der Analyse der differentiellen Genexpression, Klonierung, und Sequenzierung eingesetzten Methoden aufgeführt.

Methoden

Chemikalien, Radioisotope und Enzyme

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die verwendeten Chemikalien in p.A.-Qualität von den Firmen Flow Laboratories, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen. Die verwendeten Radiochemikalien wurden über ICN bezogen. Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer (Mannheim), Gibco BRL, New England BioLabs oder Pharmacia bezogen.

Zellkultur

5

Die epidermoide Zellline HaCaT (16) wurde von Prof. Fusenig zur Verfügung gestellt. Primäre Keratinozyten werden aus Hautstücken, die bei plastischen Operationen entfernt und normalerweise verworfen werden, gewonnen. Hierzu wurde die in 1 x PBS gelagerte Haut unter sterilen Bedingungen vom Fettgewebe befreit und in kleine Stücke (ca. 5 mm x 5 mm) zerteilt. Die Stücke wurden in 1 x PBS gewaschen und anschließend in Petrischalen 12 bis 16 Std. bei 4°C mit der Epidermis nach oben in Dispase (Grade II, 2,4 U/ml, Boehringer Mannheim) inkubiert. Anschließend wird die Epidermis von der Lederhaut abgezogen und in 1 x PBS gewaschen. Die Stücke werden für 5 bis max. 15 min in einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,2% Trypsin und 0,2% EDTA in 1 x PBS gelöst) bei 37°C inkubiert. Die Keratinozyten wurden aus dem enzymatisch zersetzen Keratingerüst mechanisch freigesetzt. Durch die Zugabe von mindestens dem dreifachen Volumen 10%igem FCS wurde die Trypsinisierung abgestoppt. Die pelletierten primären Keratinozyten werden in Medium (s. u.) resuspendiert und für die weitere Kultivierung auf Petrischalen verteilt.

15

Die Zellkulturen werden in einem Inkubator bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

20

HaCaT-Medium

25

Dulbecco's Mod. Eagle Medium w. Sodium Pyruvat (GibcoBRL)

Hinzugefügt werden 5 ml Antibiotikum (Penicillin-/Streptomycin, 10000 µg/ml, Flow-Laboratories), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 50 ml FCS (100%).

30

Keratinocyten-Medium

KBM (Keratinocytes Basal Medium, Clonetics)

35

Hinzugefügt werden 500 µl Gentamicinsulfat (50 mg/ml), 500 µl Amphotericin (50 µg/ml), 500 µl Insulin bovine (5 mg/ml), 300 µl Epidermal growth factor (0,1 µg/ml), 500 µl Hydrocortison (0,5 mg/ml).

Bei ca. 70% konfluent gewachsenen Zellen wurden die Kulturen mit UVB bestrahlt und für unterschiedlich lange Zeitdauer weiter inkubiert, bevor sie für die Isolation der RNA geerntet wurden.

45

UVB-Bestrahlung

40

Für die UVB-Bestrahlung wurde eine Bestrahlungsbank aus vier FS20-Sonnenlampen (Westinghouse Electric Corp., Pittsburgh) verwendet. Das Medium wurde für die Bestrahlung gegen PBS ausgetauscht und die Zellen wurden ohne Deckel dcm UV-Licht (100 J/m²) ausgesetzt.

50

Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

55

Für die Isolation der Gesamt-RNA wird das Trizol-Reagenz (Gibco-BRL) nach Herstellerangaben verwendet. Für die RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen wurde je Petrischale 1,6 ml Trizol eingesetzt. Abweichend von Herstellerprotokoll wurde zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen die wäßrige Phase der ersten Extraktion ein zweites mal mit Trizol extrahiert.

60

Für die RNA-Präparation aus Haut-Biopsien (0,3 mm Dermatomsektionen) wurden die Gewebestücke nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebestücke wurden bis zur Präparation bei -70°C aufbewahrt. Mit Hilfe eines Dismembrators (Braun) wurde das gefrorene Gewebe unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Die Kammer wurde auf Eis geöffnet und das Gewebspulver mit 1,5 ml Trizol überschichtet. Die Probe wurde erneut für 30 sec im Dismembrator geschüttelt. Nach dem Öffnen der Kammer wurde das gefrorene Trizol bei RT aufgetaut und anschließend in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der RNA-Isolation aus Kulturzellen.

65

DNase-Behandlung von RNA

60

10 µg RNA wurden mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Für die entsprechende Anzahl von Proben wird ein Master-Mix hergestellt, der für jeden Ansatz 60 µl DEPC-Wasser, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl 1 M MgCl₂, 1 µl DNase I (RNase frei, 10 U/µl, Boehringer Mannheim) und 0,4 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Boehringer Mannheim). Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

65

Für die Extraktion der RNA wurde Trizol verwendet (1 ml Trizol + 200 µl Chloroform). Nach der alkoholischen Prä-

zipitation wird das Pellet in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 42°C im Wasserbad für wenige Minuten gelöst. Die Reinheitskontrolle erfolgte photometrisch und mit Hilfe eines analytischen Agarose-Geles.

cDNA-Synthese

5 Für cDNA-Synthese wurden jeweils 333 ng DNase behandelte RNA in 11 µl DEPC behandeltem Wasser eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl des jeweiligen 3' dT-Primers (TA, TG und TC; je 2 µM) wurden die Proben 10 min bei 70°C de-naturiert und anschließend weitere 10 min auf Eis inkubiert. Aus einem Master-Mix wurden 8 µl auf die RNA verteilt. Dieser enthielt für jeden Ansatz 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL), 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Boehringer Mannheim), 10 4 µl 5 × Reaktionspuffer (50 mM Tris · CL (pH 7,6), 60 mM KCl und 10 mM MgCl₂, Gibco BRL) und 1 µl dNTP-Mix (400 µM).

Nach Vorwärmung der Ansätze auf 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL) gestartet. Die Proben wurden für 40 min bei 37°C im Wasserbad und anschließend für weitere 20 min einem Heizblock bei 40°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Ansätze anschließend 15 5 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA-Präparationen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Differentielles mRNA Display (DD-PCR)

Für jede der untersuchten Proben wurden 2 µl der entsprechenden cDNA in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß eingesetzt. 20 Die übrigen Komponenten wurden in Form eines Master-Mixes vorbereitet. Für jeden Ansatz wurden folgende Komponenten eingesetzt:

25 2 µl Primer 1 (2 µM)
2 µl Primer 2 (2 µM)
1,8 µl Taq-Polymerase-Puffer (10×)
2 µl Gelatine (0,1%)
1,6 µl dNTP-Mix (25 µM)
6,2 µl ddH₂O
0,4 µl α-³²P-dCTP.

30 Jeweils 16 µl des Master-Mixes wurden zu der cDNA gegeben und mit 80 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz über-schichtet.

Die Taq-Polymerase wird ebenfalls in Form eines Master-Mixes vorbereitet und nach der ersten Denaturierungs- und Bindungsphase (Annealing) dem Ansatz zugefügt ("hot-start").

35 Enzym-Master-Mix

0,4 µl Taq-Enzym (5 U/µl)
0,2 µl Taq-Polymerase-Puffer (10×)
40 1,4 µl ddH₂O.

45 Im Anschluß an die erste Annealing-Phase mit 41°C verblieben die Proben bei 42°C. Die Ölphase eines jeden Ansatzes wurde durchstochen und 2 µl des Taq-Polymerase Master-Mixes hinzugefügt. Sobald alle Proben mit Enzym versehen sind, wird mit der ersten Elongationsphase begonnen.

DD-PCR-Programm

	Denaturierung	Primer-Bindung	hot-start	Elongation
50	1. Zyklus	95°C/1 min	41°C/1 min	42°C 72°C/1 min
55	2. bis 40. Zyklus	94°C/50 sec	42°C + 0,1°C/Zykl. 1 min	- 72°C/1 min

Nach Beendigung aller PCR-Zyklen wurde eine 5' Elongationsphase bei 72°C angehängt. Ein Aliquot (5–7 µl) eines jeden Ansatzes wurde mit 1/5 5 × TBE Loading-Buffer versetzt. Die Proben wurden für 3 min bei 75°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Gleiche Probenvolumina wurden dann in einem 5%igen PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen bei konstant 60 40–45 W aufgetrennt, bis der Xylen-Xylool-Farbmarker des Ladebufferes die untere Gelkante erreicht hatte. Durch die Behandlung einer der beiden das Gel umgebenden Glasplatten mit Bindesilan, haftete das Gel nach dem Auseinanderbau an der behandelten Platte. Das an der Glasplatte haftende Gel wurde mit Haushaltsfolie abgedeckt. Um die Lage des für die Autoradiographie aufgelegten Röntgenfilms exakt festzuhalten, wurden mehrere Markierungen mittels "Tracker-Tape" (RPN 2050, Amersham) am Rand des Geles angebracht. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte 65 bei -70°C ohne Verstärkerfolie.

Elution der cDNAs aus Polyacrylamidgelen

Differentielle Banden werden mit seitlichen Punkten auf dem Röntgenfilm markiert und der Film mit Hilfe der "Trakertape"-Markierungen in seine ursprünglichen Position auf dem Gel gebracht und dort fixiert. Mit Hilfe einer Nadel wurde der Film an den Markierungspunkten durchstochen und so die Position der Bande auf dem PAA-Gel gekennzeichnet. Nach Abnahme des Filmes wurde ein dünner Streifen des Geles zwischen den Einstichstellen mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten. Dieses Stück wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl ddH₂O überführt. Zur Elution der cDNA aus dem Gelfragment wurden die Proben für 20 min auf 80°C erhitzt und anschließend für 2 min bei 13 000 rpm (15 000 g) zentrifugiert. Der gelfreie Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc (pH 5,2), 2,5 µl Glycogen (20 mg/ml) und 450 µl eiskalten Ethanols (100%) wird die eluierte cDNA bei -20°C über Nacht gefällt (optional für mind. 2 Std. in Ethanol auf Trockencis). Die cDNAs werden bei 4°C für 30 min bei 13 000 rpm (15 000 g) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% EtOH gewaschen. Das Pellet wird in TE* (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst.

Reamplifizierung differentieller cDNAs

5

10

15

Die Reamplifizierung der eluierten cDNA-Fragmente erfolgte in einem 40 µl PCR-Ansatz mit den gleichen Primerkombinationen, die für ihre ursprüngliche Generierung bei der DD-PCR verwendet wurden.

Jeweils 4 µl der eluierten cDNA in TE* werden mit:

4 µl Primer 1 (2 µM)
4 µl Primer 2 (2 µM)
3,8 µl Taq-Polymerase-Puffer (10×)
4 µl Gelatine (0,1%)
3,2 µl dNTP-Mix (250 µM)
15 µl DEPC-Wasser

20

25

kombiniert und mit Mineralöl überschichtet. Zur Reduzierung von Pipetiergenauigkeiten wurden die Komponenten für mehrere Ansätze in Form eines Mastermixes kombiniert.

Das Taq-Enzym wurde wie bei der DD-PCR in 2 µl 1× Taq-Polymerase-Puffer im "hot-start"-Verfahren zugegeben.

30

Um die Spezifität der Amplifizierung zu erhöhen wurde im Gegensatz zum DD-PCR Programm bei der Reamplifizierung ein "touch down" Protokoll verwendet. Hierbei wurde in den ersten 5 Zyklen der PCR eine erhöhte Annealing-Temperatur verwendet, die pro Zyklus so verringert wird, daß ab dem 6. Zyklus die für die Primerkombination optimale Temperatur erreicht ist. Durch die anfänglich stringenteren Bedingungen ist die Amplifizierungseffektivität zwar geringer, es wird aber sichergestellt, daß präferentiell das gewünschte Produkt amplifiziert wird. Nachdem so ausreichende Mengen des gewünschten Templates vorliegen, kann bei der an die Primer angepaßten Annealing-Temperatur mit hoher Effizienz amplifiziert werden. Der Erfolg dieser Vorgehensweise zeigte sich im nachfolgenden präparativem Agarosegel durch kaum vorhandene unspezifische PCR-Produkte.

35

40

45

50

	Denaturierung	Primer-Bindung	hot-start	Elongation
1. Zyklus	95°C/1 min	50°C/1 min	50°C	72°C/2 min
2. bis 5. Zyklus	94°C/50 sec	49°C-1°C/Zykl 1 min	-	72°C/2 min
6. bis 35. Zyklus	94°C/50 sec	45°C/ 1 min	-	72°C/2 min + 2 sec/Zykl.

Klonierung von PCR-Produkten

55

Für die Ligation wurden die reamplifizierten cDNA-Fragmente nach Größenfraktionierung im Agarosegel mit JetSorb (Genomed) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Für die TA-Klonierung von PCR-Produkten wurde der TA-Klonierungskit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgte im Vektor : cDNA-Verhältnis von 1 : 3.

60

Herstellung einer lambda-cDNA-Bank

65

Zur Isolation von cDNA-Klonen voller Länge wurde mit poly(A)⁺-RNA aus HaCaT-Zellen eine cDNA-Bank in Uni-ZAP-XR (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Die Anreicherung von poly(A)⁺ mRNA aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) entsprechend der Herstellervorschrift durchgeführt. Für die Herstellung der cDNA-Bank aus 4 µg poly(A)⁺-RNA wurde der ZAP-cDNA Klonierungskit (Stratagene, Heidelberg, Germany) nach den Vorschlägen des Herstellers mit Ausnahme folgender Modifikationen eingesetzt:

- für die Herstellung des 1. Stranges cDNA wurde Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco, BRL, Eggenstein) eingesetzt.
- für die Größenfraktionierung der Xho I gespaltenen cDNA wurde eine S-400-Zentrifugationssäule verwendet.

5 Nach Ligation der cDNA-Fraktion mit Molekülen > 500 bp in Uni-ZAP-XR Vektorarme wurde die Bank unter Verwendung des Gigapack III Gold Verpackungsextraktes (Stratagene, Heidelberg, Germany) in λ -Phagenpartikel verpackt. Die nach einmaliger Amplifizierung erhaltene cDNA-Bank hatte einen Titer von 1.4×10^{10} pfu/ml.

Klonierung von cDNA-Klonen voller Länge

10 Für die Identifizierung von hurpin cDNA-Klonen wurden 10^6 pfu auf Hybond-N⁺ Nylonmembranen (Amersham, Braunschweig) unter Verwendung von Standardmethoden (17) übertragen. Als Sonde wurde die 412 bp lange HUR7 cDNA, nach radioaktiver Markierung mit [α -³²P]dCTP unter Verwendung des Megaprime DNA Markierungskits (Amersham, Braunschweig, Germany), eingesetzt. Die Nylonmembranen wurden für 2 h bei 68°C in QuickHyb (Stratagene, Heidelberg, Germany) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde dann in der gleichen Lösung über Nacht bei 68°C durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen unter stringenten Bedingungen (final bei 55°C in 0.1×SSC, 0.1% SDS) gewaschen und positive Plaques durch Autoradiographie mit Hyperfilm (Amersham) sichtbar gemacht. Durch eine zweite Filterhybridisierung mit immobilisierten Phagen jeweils eines positiven Plaques wurden individuelle Phagen identifiziert, die mit der HUR 7-cDNA hybridisierten. Die cDNA-Inserts dieser Phagen wurden durch in vivo Excision des pBlueScript SK⁻ Phagenid aus dem Phagengenom nach Herstellerangaben präpariert.

Restriktionsanalyse der cDNA-Klone

25 Die cDNA-Inserts aus den pBS-Vektoren wurden mit Eco RI (3 U/ μ g) und Xho I herausgeschnitten. Da der pBS-Vektor eine nur unwesentlich andere Größe als die cDNA-Fragmente hatte, wurde zur besseren Identifizierung und Trennung der Fragmente zusätzlich der Vektor mit Pvu I (1,7 U/ μ g) geschnitten. In allen Restriktionsansätzen wurde mit Boehringer-"high-salt"-Puffer gearbeitet. Für weitere Restriktionsanalysen wurden die Plasmide mit NotI, Pst I, Xba I, Sac I und Bam HI nach Standardvorschrift (17) geschnitten und in einem 1%igen Agarosegel analysiert.

Northern-Blot Analysen

30 10 μ g Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen wurden in einem 1%igen Formaldehyd-Agarose-Gel größenfraktioniert und mittels Kapillar-Blot-Verfahren auf Hybond N⁺-Nylonmembranen (Amersham) transferiert. Northern-Blots mit poly(A)⁺-mRNA aus verschiedenen humanen Geweben (MTN: multiple tissue Northern blots) wurden von Clontech bezogen.

35 Für die Hybridisierung von Filtern wurden die DNA-Fragmente, die als Hybridisierungssonden eingesetzt wurden, mit [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; ICN) unter Verwendung des "Megaprime labeling kit" von Amersham markiert. Freie Nukleotide wurden durch Chromatographie über eine S300-Zentrifugationssäule (Pharmacia) abgetrennt. Die Einbaurate von [³²P]-dCTP in die DNA wurde durch Messen eines Aliquots der Markierungsreaktion in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug $1-2 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA.

40 Die Hybridisierung wurde in DIG-Easy-Hyb-Lösung (Boehringer Mannheim) über Nacht durchgeführt. Nach stringentem Waschen der Membranen (final 55–60°C, 0.1% SDS, 0.1 × SSC) wurden Signale durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham) mit Verstärkerfolie bei -70°C sichtbar gemacht.

RT-PCR Analysen

45 Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde eine rekombinante Mo-MLV Reverse-Transkriptase ohne RNase-H Aktivität (Superscript II, Gibco BRL) mit dem mitgelieferten 5 × Puffersystem [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂] eingesetzt. Je Ansatz wurde 1 μ g Gesamt-RNA in ddH₂O und 10 pmol dT₁₂₋₁₈-Primer (Pharmacia) eingesetzt (Gesamt-Vol.: 11 μ l). Nach Hitzedenaturierung (10' bei 70°C) der RNA und Abkühlen auf Eis wurden zugegeben:

4 μ l 5 × Puffer
 55 2 μ l 0.1 M DTT
 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 1 μ l RNasin (40 U, Promega).

50 Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l (200 U) Reverse-Transkriptase (RT) gestartet und lief bei 42°C für 1 h. Aktivierung der RT erfolgte durch 5 minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 70°C. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert. Für den Nachweis spezifischer Transkripte wurde mit Hilfe von zwei spezifischen Primern das entsprechende cDNA-Fragment in der PCR amplifiziert. Die Sequenz der verwendeten Primer wurde mit Hilfe des Computerprogramms "Oligo", Version 3.3 optimiert (Kontrolle der Duplex-Bildung, Homologie der 3' und 5' Enden zueinander, Selbstkomplementarität, Schmelztemperatur des Primers). Um die Reaktionsbedingungen in der PCR zu optimieren, wurden mit jedem Primer-Paar und einer Positivkontrolle mehrere Test-PCR-Analysen durchgeführt, in denen die MgCl₂-Konzentration (1,5–2,5 mM) und die Temperatur (Variation der mit "Oligo" ermittelten Temperatur) während des Primer-Bindungsschrittes ("annealing") variiert wurden.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

sscDNA (RT-PCR) oder dsDNA

4,7 μ l 10 \times Taq-Puffer [100 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 500 mM KCl, 15 mM, MgCl₂]
 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 0,5 μ l Primer 1 (10 μ M/ μ l)
 0,5 μ l Primer 2 (10 μ M/ μ l)
 x μ l 60 mM MgCl₂ (je nach Primer, um Endkonzentration von 2,0 mM oder 2,5 mM zu erreichen)
 ad 47 μ l ddH₂O.

5
10
15
20
25

Auflistung der bei RT-PCR-Analysen verwendeten Primer

Gen/Primer		Sequenz (5'-3')	Hybridisierungs-Temp. [°C]	MgCl ₂ [mM]
hurpin 1	5'	TAAAGGGCAATGGGACAGGGAGT	58	1,5
hurpin 2	3'	GC GGATGTGACAGTAAAGCCTATG		
β -Aktin-1	5'	CGGGAAATCGTGGTGACATTA	63	2,0
β -Aktin-2	3'	GTTGGCGTACTGGTCTTGCGGAT		

Die Verdunstung während der Inkubation wurde durch Überschichten des Reaktionsansatzes mit Mineralöl verhindert. Um das Entstehen unspezifischer Produkte einzuschränken, wurde ein "hot-start" durchgeführt, bei dem 2 U Taq-Polymerase in 3 μ l 1 \times Taq-Puffer zum Reaktionsansatz nach dem ersten Denaturierungsschritt der PCR zugegeben wurde.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler der Firma Biometra (Trioblock).

Standard-PCR-Programm

94°C: 1 min
 50°–68°C: 1 min (Primer spezifisch)
 72°C: 2 min
 Wiederholung für 25–30 Zyklen
 72°C: 5 min.

30
35
40

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in 1,5%igen Agarosegelen. Die DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter langwelligem UV-Licht für die Dokumentation sichtbar gemacht.

Die Erforschung wird durch nachfolgende Beispiele, Abbildungen und Sequenzen im Detail erläutert:

Abb. 1 zeigt das Autoradiogramm der Differential Display Analyse zur Identifizierung des ersten partiellen hurpin cDNA Klons (HUR 7) als UV-reprimierte Sequenz. Die entsprechende Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung der Organisation der hurpin cDNA-Klone voller Länge entsprechend der zugrundeliegenden Sequenzanalyse.

Tab. 1 stellt die Ergebnisse des Homologievergleiches der Aminosäuresequenz von hurpin mit verschiedenen bekannten Mitgliedern des Ovalbumin-Zweiges der Familie der Serpine zusammen.

Abb. 3 zeigt den Homologievergleich der Aminosäuresequenz von hurpin und dem "squamous cell carcinoma antigen" (SCCA) 1 und SCCA 2. Identische Aminosäuren an gleicher Position sind entsprechend hervorgehoben. Die Position der in Serpinen konservierten Aminosäuren sind durch Balken oberhalb der Aminosäuren markiert. Schwarze Balken zeigen dabei in hurpin konservierte Aminosäuren an, während ungefüllte Balken eine Abweichung von der konservierten Aminosäure markieren. Schraffierte Balken zeigen Aminosäuren, die typischerweise bei Ovalbumin-Serpinen von der konservierten Aminosäure abweichen. Die bei inhibitorischen Serpinen konservierten Aminosäuren des reaktiven Zentrums in Position P₁₇–P₈ sind umrahmt und die Konsensussequenz für inhibitorische Serpine ist durch eine gestrichelte Linie unterhalb der hurpin-Sequenz markiert. Die Aminosäuren des reaktiven Zentrums in P₁–P₁ Position sind ebenfalls markiert.

Abb. 4 zeigt das Autoradiogramm einer Hybridisierung des radioaktiv markierten cDNA-Inserts des hurpin Klones 1.1 gegen Gesamt-RNA aus bestrahlten und unbestrahlten HaCaT-Zellen.

Abb. 5 RT-PCR Analyse zum Nachweis hurpin spezifischer Transkripte in humanen, kultivierten retinalen Pigmentepithelzellen (RPE), Iris-Epithelzellen (IPE), normaler Haut, primären, kultivierten Keratinozyten (NHK), der epidermalen Zelllinie HaCaT, sowie befallener (a) und unbefallener (u) Haut von drei Patienten mit Psoriasis.

Abb. 6–8 Restriktionskarten der Plasmidvektoren. Bei den Plasmidvektoren handelt es sich um pBlueScript SK⁺ in die über Eco RI und Xho I die hurpin/PI13 cDNAs voller Länge kloniert sind.

Anhang: Sequenzen der hurpin/PI13 cDNA-Klone.

45
50
5560
65

Beispiele

Beispiel 1

5

1. Differential Display (DD-PCR) Analysen

HaCaT-Zellen wurden mit einer subletalen UVB-Dosis (100 J/m^2) bestrahlt und 0,5, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h später geerntet. Für die DD-PCR Analysen wurde die RNA aus Zellen 8 h und 24 h nach UVB-Bestrahlung und aus unbestrahlten Zellen zu Beginn des Experiments sowie nach 24 h in Kultur verwendet. Die parallele Analyse dieser 4 Zellpopulationen macht es möglich, Banden auszuschließen, die zufällig zwischen den verschiedenen Spuren des Displays variieren und reduziert somit die Wahrscheinlichkeit falsch positive Banden für die folgenden Analysen auszuwählen. Weiterhin kann durch diese parallele Analyse das Potential der DD-PCR zur Erfassung von quantitativen Unterschieden als zusätzliches Kriterium bei der Identifizierung von UVB-abhängig regulierten Sequenzen eingesetzt werden.

In Abb. 1 ist ein Teil einer solchen "differential display" (DD) Analyse dargestellt. Unabhängige DD-PCR-Analysen zeigten, daß mit dem erarbeiteten Protokoll für eine bestimmte Primer-Kombination ein bestimmtes Bandenmuster reproduzierbar hergestellt werden konnte. Das komplexe Bandenmuster zeigt, daß die UVB-Bestrahlung sowohl zu einer Induktion als auch einer Repression verschiedener Gene innerhalb von 24 h nach Bestrahlung führt.

Für *hurpin* konnte bei dieser Analyse eine differential nach UVB-Bestrahlung regulierte cDNA-Bande von 412 bp dargestellt werden. Da die UVB-Bestrahlung einen reprimierenden Effekt auf die Transkriptmenge des korrespondierenden Gens hatte, wurde als Bezeichnung für diese cDNA HUR 7, für HaCaT UV repressed, gewählt.

Beispiel 2

2. Isolation von *hurpin* cDNA-Klonen voller Länge

25

Mit Hilfe der HUR7 cDNA wurden im folgenden *hurpin* cDNA-Klone voller Länge aus einer HaCaT cDNA-Bank isoliert. Nach Hybridisieren der radioaktiv markierten HUR 7 cDNA gegen $10^6 \lambda$ -cDNA-Klone zeigten 67 Klone ein positives Signal. Von diesen wurden 20 für eine zweite Hybridisierung ausgewählt. Von den 15 positiven Klonen aus diesem zweiten Screening wurden 12 für die *in vivo* Excision des Insert tragenden pBlueScript SK⁻ Phagemid aus dem Phagengenom ausgewählt. Eine Restriktionsanalyse der erhaltenen Phagemide zeigte, daß 3 Klone nicht mit HUR 7 und den übrigen Phagemiden korrespondierten. Die 9 verbleibenden Klone konnten aufgrund ihrer Größe und ihres Restriktionsmusters in 3 Gruppen eingeteilt werden.

35

Beispiel 3

3. Sequenzanalyse der *hurpin* cDNA-Klone

Jeweils ein repräsentativer Klon der 3 Phagemidgruppen wurde vollständig sequenziert. Eine Zusammenfassung der Eigenschaften dieser Klone ist in Abb. 2 dargestellt. Der Klon 1.1 mit einem 3130 bp großem cDNA-Insert repräsentiert das 3,4 kb Transkript, während Klon 12.2 mit einem 2637 bp großem cDNA-Insert das kleinere 3,0 kb Transkript repräsentiert. Der Klon 16.1 korrespondiert ebenfalls mit dem 3,0 kb Transkript, enthält aber eine 188 bp große Insertion, die in den übrigen Klonen fehlt. Da diese Insertion den offenen Leserahmen unterbricht, handelt es sich nicht um eine alternativ gespleißte RNA-Variante. Obwohl keine perfekte Splice-Konsensus-Sequenz gefunden werden konnte, repräsentiert die Insertion damit vermutlich ein ungeschleißtes Intron. Die vergleichende Analyse der Sequenz der verschiedenen Klone zeigte, daß die in Northern-Blot beobachteten distinkten zwei Transkripte auf die Verwendung von unterschiedlichen Polyadenylierungssignalen zurückzuführen ist.

Das 3,0 kb große Transkript wird durch die Verwendung eines Konsensuspolyadenylierungssignals AAUAAA 13 nt oberhalb des poly(A)-Schwanzes generiert. In der 3' untranslatierten Region (3' UTR) des 3,4 kb Transkriptes finden sich zwei funktionelle Varianten des Konsensussignals mit der Sequenz AAUAAU und AAUAAA, die sich 56 nt bzw. 22 nt oberhalb des poly(A)-Schwanzes befinden.

Alle cDNA-Klone enthalten einen einzelnen offenen Leserahmen (ORF) mit einer Länge von 1176 bp beginnend von Position 103 der Sequenz des Klons 1.1 mit einem ATG in einer Kozak Konsensussequenz. Klon 1.1 enthält mit 102 bp den längsten 5' untranslatierten Bereich (5' UTR).

Das putative Protein besteht aus 391 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von etwa 44 kDa und einen pI von 5,47.

Datenbanksuche gegen die EMBL-Sequenz-Datenbank zeigte, daß das durch die cDNA-Klone kodierte Protein neu ist, aber deutliche Homologien zu Mitgliedern des Ovalbumin-Zweiges der Serpin-Superfamilie von Proteaseinhibitoren hat (Tabelle 1). Die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz fand sich zwischen *hurpin* und den "squamous cell carcinoma antigen" (SCCA) 1 (59,1%), SCCA 2 (58,5%) und bomapin/PI10 (43,5%). Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, daß *hurpin* ein typisches Serpin darstellt, bei dem 46 der für Serpines als charakteristisch beschriebenen 51 Aminosäuren (5) konserviert sind (Abb. 3).

Zusätzlich zu den Übereinstimmungen auf Aminosäureebene besitzt *hurpin* alle strukturellen Merkmale, die die Ovalbumin-Serpine von den übrigen Mitgliedern der Serpin-Superfamilie trennen:

65

- *hurpin* besitzt keine N-terminale Verlängerung und der ORF beginnt mit der Aminosäure 23 von α -1-Antitrypsin (α -1-PI).
- *hurpin* besitzt keine c-terminale Verlängerung und endet mit Pro³⁹¹, korrespondierend zu Pro³⁹¹ in α -1-PI.
- die vorletzte Aminosäure ist Ser und nicht Asp, wie bei den übrigen Mitgliedern der Superfamilie.

- hurpin besitzt eine variable Aminosäure anstelle von Valin in Position 388 bezüglich α -1-PI.
- hurpin besitzt kein typisches N-terminales hydrophobes Signalpeptid.

Durch Vergleich mit anderen Ovalbumin-Serpinen konnten die Spezifität bestimmenden Positionen P₁-P_{1'} des potentiellen reaktiven Zentrums als Thr³⁵⁶-Ser³⁵⁷ identifiziert werden. Die große Identität der "hinge"-Region von hurpin mit der postulierten Konsensussequenz der inhibitorischen Serpine (18, 19), lässt eine Protease inhibierende Aktivität für hurpin vermuten (Abb. 3).

Beispiel 4

4. Northern-Blot Analysen

Bei Verwendung der cDNA-Inserts der volle Länge cDNA-Klone für HUR 7 als radioaktive Sonde im Northern-Blot mit HaCaT-Zellen Gesamt-RNA konnte das gleiche Hybridisierungsmuster wie mit dem ursprünglichen "differential display" Klon (HUR 7) generiert werden. Die detektierten zwei Transkripte von ca. 3.0 und 3.4 kb zeigten die gleiche Abnahme der steady-state mRNA-Menge nach UVB-Bestrahlung mit 100 J/m² wie nach Hybridisierung mit dem ursprünglichen HUR 7 Fragment. Ebenso wie mit dem ursprünglichen HUR 7 cDNA-Klon konnte auch mit den cDNA-Klonen voller Länge in anderen humanen Geweben (MTN-Northern-Blots: Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Pankreas) kein Signal detektiert werden.

Beispiel 5

5. RT-PCR Analysen

Bei RT-PCR Analysen mit spezifischen Primern für hurpin konnte eine Expression nicht nur in HaCaT-Zellen, sondern auch in kultivierten primären Keratinozyten und in Biopsiematerial aus gesunder Haut nachgewiesen werden. Kultivierte menschliche retinale Pigmentepithelzellen sowie Iris-Epithelzellen zeigten dagegen keine hurpin Expression. Die geringere Expression von hurpin in normaler Haut im Vergleich mit der Expression in HaCaT-Zellen oder kultivierten primären Keratinozyten ließ eine Assoziation von hurpin mit dem Proliferationszustand von Keratinozyten vermuten. Ein charakteristisches Merkmal der psoriatischen Haut ist die Hyperproliferation der Keratinozyten. Um die Assoziation von hurpin mit der Proliferation von Keratinozyten zu überprüfen, wurde die Expression von hurpin in befallener und unbefallener Haut von 2 psoriatischen Patienten mittels RT-PCR untersucht. Die befallene Haut zeigte dabei eine bis zu 10–14-fach stärkere Expression von hurpin im Vergleich mit der unbefallenen Haut desselben Patienten.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Hurpin/PI 13 Sequenz: Klon R7-1.1
Gesamtzahl der Nukleotide: 3143

5 CTATAAATTA AGGATCCAG CTACTTAATT GACTTATGCT TCCTAGTCG TTGCCAGCC
 ACCACCGTCT CTCCAAAAAC CCGAGGTCTC GCTAAATCA TCATGGATT ACCTGGCGCC
 GTCAGCACTC GACTTGGTT TGATCTTTCA AAAGAGCTGA AGAAAACAAA TGATGGCAAC
 ATCTTCTTTT CCCCTGTGGG CATCTGACT GCAATTGGCA TGGTCCTCCT GGGGACCCGA
 10 GGAGGCCACCG CTTCCCAGTT GGAGGAGGTG TTTCACTCTG AAAAAGAGAC GAAGAGCTCA
 AGAATAAAGG CTGAAGAAAA AGAGGTGATT GAGAACACAG AAGCAGTACA TCAACAATT
 CAAAAGTTTT TGACTGAAAT AAGCAAACTC ACTAATGATT ATGAACTGAA CATAACCAAC
 15 AGGCTGTTG GAGAAAAAAC ATACCTCTTC CTTCAAAAT ACTTAGATTA TGTTGAAAAA
 TATTATCATG CATCTCTGGA ACCTGTTGAT TTTGTAATG CAGCCGATGA AAGTCGAAAG
 20 AAGATTAATT CCTGGGTTGA AAGCAAACAA AATGAAAAAA TCAAGGACTT GTTCCCAGAT
 GGCTCTATTA GTAGCTCTAC CAAGCTGGTG CTGGTGAACA TGGTTTATTT TAAAGGGCAA
 TGGGACAGGG AGTTTAAGAA AGAAAATACT AAGGAAGAGA AATTTGGAT GAATAAGAGC
 25 ACAAGTAAAT CTGTACAGAT GATGACACAG AGCCATTCTT TTAGCTTCAC TTTCTGGAG
 GACTTGCAGG CAAAATTCT AGGGATTCCA TATAAAACAA ACGACCTAAG CATGTTGTG
 CTTCTGCCA ACGACATCGA TGGCCTGGAG AAGATAATAG ATAAAATAAG TCCTGAGAAA
 30 TTGGTAGAGT GGACTAGTCC AGGGCATATG GAAGAAAGAA AGGTGAATCT GCACTTGCC
 CGGTTTGAGG TGGAGGACGG TTACGATCTA CAGGCGGTCC TGGCTGCCAT GGGGATGGGC
 GATGCCCTCA GTGAGCACAA AGCCGACTAC TCGGGAAATGT CGTCAGGCTC CGGGTTGTAC
 35 GCCCAGAAGT TCCTGCACAG TTCTTGTG GCAGTAACAG AGGAAGGCAC CGAGGCTGCA
 GCTGCCACCG GCATAGGCTT TACTGTCACA TCCGCCAG GTCATGAAAA TGTTCACTGC
 AATCATCCCT TCCTGTTCTT CATCAGGCAC AATGAATCCA ACAGCATCCT CTTCTCGGC
 40 AGATTTCTT CTCCCTAAGA TGATCGTTGC CATGGCATTG CTGCTTTAG CAAAAACAA
 CTACCAGTGT TACTCATATG ATTATGAAAA TCGTCCATTC TTTAAATGT TGTCTCACTT
 GCATTTCCAG TCTTGGCCAT CAAATCAATG AITTAATGAC TCCAATAATG TGTGTGTTA
 45 TAACCATCCT CGAAAGTGAATGTCCTTT TTTTGTGCCA TGCGTAAGGT GAGTCAAACC
 AACACCTCATT GATAATCTCC CCTTTGGTTT CCTTTGAAAG TAAATTGGTA TCTTGTAGTT
 TTGTGCACAC GAAAGGAGAG AAAGTTCTC CAGTAAAGAG TACGAACAG TAATTTGGG
 50 GGGTCTCTCT AATTCTGGTA TTTGACATG TTATAATACG CAAGTAAAT AAAACAATAG
 TTTACTCAGC TCATGTTACT ATTCCCCAAC AGATATTGTG GCAAATCACA CATAGGAAAG
 AGGATTGGG AATACAGTAG CAAAACATAA ATTAAAACTC AAATGCCAG GACAAAATAA
 55 AACAAATATAC CAGATGGAGA GGATGCCGT ATTTTCATCT TCCATTCTAA CATTATCCAT
 TGTTAGATGC ATAAGCATT TGATATTGTG TAATAAATGT GGTATTTGAG AAGATAAATG
 ATGTAGTTGA TCAGTAATCC TCCTCTATCA CCTTTTTAGA CTTTGTAGG TAAATATTTG
 60 GACTAACTTT TAGAAAAGTT TCCCTTTTT TCTCCATTAA CATTTTCTG GTTTTTTTT
 TTTTTTTGAGTGTGAGGTACG AGTATTACCA AATGATATT TCTGAAGATG CTTTTGGAA
 AGCTCTGAAT CTATACCTAA TGCTCTTAAT TATTGGCTTG TTTCATTTT TCCCTCCAGT
 65 TTTTAACAAG ATCACATAAC TGGCTTATTT TTAACAGCCTT TGTCAAACATA CAATTTACAT

GCCGTAAAAT GTACACACTG TAATTTATA ATTCAATTGAC TTTTAGTAAA TTTCTAGCG
 TTATGCATCG CCACAATCCA GTTTAGAAT ATTTCCATGA CCCTAAGAAG TTCCCTCATG
 TCTATTAATA TTCCCAATCC TAGGCACCAC TGAGTTGTT TCTGTCTTA TAAGTTTT
 5 TTTCTACATC TTATATAAAAT GGAATCATAA TACATGTAGT ATTTTGTGTC TGGCGTCTG
 CACTTAGCAT GGTGTTCTTG AGGTTCATCT GTTGTAGTAT GTATTGATAC TTAGGATTT
 TTTATTGCCG AATACTATTC CATTGCATGG AAAAGACCTA TTTTATTTCT AGGTTCACCA
 GTTGAGGGAC ATTTGGATTG TTCCCACCTC TTGGGCTGTT AGGAATAATG TTGCTCTGAA
 CATGTAAATA AAGATCTTG TGTCACATA TGTTTTCAT TTTCTGTTGG GGAGATTCCC
 10 TAGGCTAGAA ATTGCTGGC CATATGAAAA ATCAATAGTT AGCTTGTAAGAACAGTCA
 AACTGTTTC CCAACGTGAC ATTTTATATT CCCACCAGGA ATGTTTAAAA CTAGTGTCTT
 CAAATCCTCA CCAACATCCA GGATTGTGTC TTTATGATTA TAGCCATTAGTAGGTACA
 AAGTGGCATC TCATGGGGT TTTAATTGTC ATTTCCATAA TATCTAATTA GGTTGAGCTT
 15 TTTTATGTG CTTATTGGCC ATTTGTTGA CTTTGTGTTGG TGAAATGTAT ACAAAATCATT
 TGCTCATTAAATC TCTGGCTTAC AAGTCCTTAA TTTATCAAAT ATATGATACG TGGACATTTC
 CTCATAAAAAA AAAAAAAA AAA
 20
 25
 30

35

40

45

50

55

60

65

Hurpin/PI 13 Sequenz: Klon R7-16.1
Gesamtzahl der Nukleotide: 2832

5 ACCGTCTCTC CAAAAACCCG AGGTCTCGCT AAAATCATCA TGGATTCACT TGGCGCCGTC
 AGCACTCGAC TTGGGTTTGA TCTTTCAAA GAGCTGAAGA AAACAAATGA TGGCAACATC
 TTCTTTCCC CTGTGGGCAT CTTGACTGCA ATTGGCATGG TCCTCCTGGG GACCCGAGGA
 GCCACCGCTT CCCAGTTGGA GGAGGTGTTT CaCtCTGgAA AAAGAGACGA AGAGCTCAAG
 10 AATAAAGGCT GAAGAAAAAG AGATTGAGAA CACAGAAGCA GTACATCAAC AATTCCAAA
 GTTTTGACT GAAATAAGCA AACTCACTAA TGATTATGAA CTGAACATAA CCAACAGGCT
 15 GTTTGGAGAA AAAACATACC TCITCCTTCA AAAATACTTA GATTATGTTG AAAAATATTA
 TCATGCATCT CTGGAACCTG TTGATTTGT AAATGCAGCC GATGAAAGTC GAAAGAAGAT
 TAATTCCCTGG GTTGAAGCA AAACAAATGA TGTGGAAACT GAGGCACAGA GAGTTAAAT
 20 AACTTGCCC AgATTCCCTCA GCTGATAAGA GGCAAACTGG ATGCTAACAG AGGCATCTGA
 CCCCAGAGTC TGGACTCTTA ACCATGAACC TTAATTTATC CACTGGATA AATAGGCAT
 GGGCAAAATG AGAACCTCCC CGTCGATTCT GCCAGCAAAC CCTTTGTCAAG CAAGGCCCTC
 25 AgAAAAAAATC AAGGACTTGT TCCCAGATGG CTCTATTAGT AGCTCTACCA AGCTGGTGC
 GGTGAACATG GTTTATTTA AAGGGCAATG GGACAGGGAG TTTAAGAAAG AAAATACTAA
 GGAAGAGAAA TTTTGGATGA ATAAGAGCAC AAGTAAATCT GTACAGATGA TGACACAGAG
 30 CCATTCCCTT AGCTTCACCT TCCTGGAGGA CTTGCAGGCC AAAATTCTAG GGATTCCATA
 TAAAAACAAAC GACCTAAGCA TGTTGTGCT TCTGCCAAC GACatCGATg GCCTGGAGAA
 gATaATAGAT aAaATaAgTC CTGAgAAATT GGTAGAgTGG ACTAgTCCAG GGCATATGGA
 35 AGAAAGAAAG GTGAATCTGC aCTGCCCG GTTTGAGGTG GAGGACGGTT ACgATCTAcA
 gGCGGTCTG GCTGCCATGG GGATGGCGA TGCCCTCAGT GAGCACAAAG CCGActACTC
 GGGAAATGTCG TCAGGCTCAG GGTTGTAAGC CCAGAAGTTC CTGCACAGTT CCTTTGTGGC
 40 AGTAACGTGAG GAAGGCACCG AGGCTGCAGC TGCCACCAGC ATAGGCTTTA CTGTCACATC
 CGCCCCAGGT CATGAAAATG TTCACTGCAA TCATCCCTTC CTGTTCTTCA TCAGGCACAA
 TGAATCCAAC AGCATCCTcT TcTTcGGCAG ATTTTcTTcT CCTTAAGAtG ATcGTTGCCA
 45 TGGCATTGCT GCTTTTAGCA AAAAACAACT ACCAGtGTTA cTCATATGAT TATGAAATC
 GTCCATTcTT TTAAAtGtTG TcTCActtGC ATTTCCAGTc TTGGCCATCA AATCAATGAT
 TTAATGACTC CAATAAtGtG TGTGTTATA ACCAAtCCTCG AAAGTGAAAT GTCCtTTtT
 50 TTGTGCCATG CGTAAGGtGA gTCAAACCAA ACCTCATTGA TAATcTcCCCC tttGGTTTCC
 TTTGAAAGTA AATTGGTATC TTGTAGTTT GTGCACACGA AAGGAGAGAA AGTtTcTCCA
 GTAAAGAGTA CGAAACTAGTA ATTTGGGGG GTCTCTcTAA TTcTGGTATT TTGACATGTT
 55 ATAATACGCA AGTAAAATAA ACAATAGTT TAcTCAGCTC AtGtTACTAT TCCCCAACAG
 ATATTGTGGC AAATCACACA TAGGAAAGAG GATTTGGAA TACAGTAGCA AAACATAAAT
 TAAAACCTAA ATGcCCAGGA CaAAATaAAA CAATATACCA GAGGGAGAGG ATGCCGtAT
 60 TTTCATCTTC CATTCTAACCA TTATCCATTG TTAGATGGCAT AAGCATTGTT ATATTGTGTA
 ATAAAATGTGG TATTTGAGA GATAAATGAT GTAGTTGATC AGTAATCCTC CTCTaTCACC
 TTTtTAGACT TTGTAAGGTA aATATtTGGA CTAACTTTA GAAAAGTTTC CCTTTTTTC
 65 TCCATTtAcA TTTTTCTGGT TTTtTTTtT TTTTTGAGT GAGGTACGAG TATTACCAAA

TGATATTTTC TGAAGATGcT ttTTGGAAAG CTcTGAATcT AtACCTAATG cTcTtAATTA
 TTGGcTTGTT TCATTTTTT CCTCCAGTT TTAACAAGAT CACATAACTg GcTTATTTTT
 AACAGCTtTG TCAAActACA ATTTACATGC CGTAAAATGT ACACACTGTa ATTTTATAAT
 5 TCATTGACTT TTAGTAAATt tTcTAGCGTT ATGCATCGCC ACAATCCAGT TTTAGAATAT
 TTCCATGACC CTAAGAAGTT TCCTCATGTc TATTAATATT CCCAATCCTA GGCACCACTG
 AGTTGTTTTC TGTCTTTATA AGTTTTCTT TCTACATCTT ATATAAAATGG AATCATAATA
 CATGTAGTAT TTTGTGTCTG GCGTCTTGCA CTTAGCATGG TGTTCTTGAG GTTCATCTGT
 TGTAGTATGT ATTGATACTT AggATTTTT tATTGCCaA TACTATTCCA TTGCATGGAA
 10 AAGACCTATT TTATTTcTAG GTTCACCAAGT TGAGGGACAT TTGGATTGTT CCCACTTCTT
 gGGCTGTTAG GAATAATGTT GCTCTGAACA TGTAATAAA GaTCTTTGTG TTCAAAAAAA
 15 AAAAAAAA AA
 20

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Hurpin/PI 13 Sequenz: Klon R7-12.2
Gesamtzahl der Nukleotide: 2654

5 CTTATGCTTC CTAGTCGTT GCCCAGCCAC CACCGTCTCT CCAAAAACCC GAGGTCTCGC
 TAAAATCATC ATGGATTACAC TTGGCGCCGT CAGCACTCGA CTTGGGTTTG ATCTTTCAA
 AGAGCTGAAG AAAACAAATG ATGGCAACAT CTTCTTTCC CCTGTGGGCA TCTTGACTGC
 AATTGGCATG GTCCTCCTGG GGACCCGAGG AGCCACCGCT TCCCAGTTGG AGGAGGTGTT
 10 TCACTCTGAA AAAGAGACGA AGAGCTCAAG AATAAAGGCT GAAGAAAAG AGGTGATTGA
 GAACACAGAA GCAGTACATC AACAAATTCCA AAAGTTTTG ACTGAAATAA GCAAACATCAC
 TAATGATTAT GAACTGAACA TAACCAACAG GCTGTTGGA GAAAAAACAT ACCTCTTCCT
 15 TCAAAAATAC TTAGATTATG TTGAAAAATA TTATCATGCA TCTCTGGAAC CTGTTGATT
 TGTAATGCA GCCGATGAAA GTCGAAAGAA GATTAATTCC TGGGTTGAAA GCAAAACAAA
 TGAAAAAAATC AAGGACTTGT TCCCAGATGG CTCTATTAGT AGCTCTACCA AGCTGGTGCT
 20 GGTGAACATG GTTTATTTA AAGGGCAATG GGACAGGGAG TTTAAGAAAG AAAATACTAA
 GGAAGAGAAA TTTTGGATGA ATAAGAGCAC AAGTAAATCT GTACAGATGA TGACACAGAG
 25 CCATTCCCTT AGCTTCACCT TCCTGGAGGA CTTGCAGGCC AAAATTCTAG GGATTCCATA
 TAAAAAACAAAC GACCTAAGCA TGTTTGTGCT TCTGCCAAC GACATCGATG GCCTGGAGAA
 GATAATAGAT AAAATAAGTC CTGAGAAATT GGTAGAGTGG ACTAGTCCAG GGCATATGGA
 30 AGAAAGAAAG GTGAATCTGC ACTTGCCCCG GTTGAGGTG GAGGACGGTT ACGATCTACA
 GGCGGTCCCTG GCTGCCATGG GGATGGGCGA TGCCCTTCAGT GAGCACAAAG CCGACTACTC
 GGGAAATGTCG TCAGGCTCCG GGTGTACGC CCAGAAGTTC CTGCACAGTT CCTTTGTGGC
 35 AGTAACTGAG GAAGGCACCG AGGCTGCAGC TGCCACCGGC ATAGGCTTTA CTGTCACATC
 CGCCCCAGGT CATGAAAATG TTCACTGCAA TCATCCCTTC CTGTTCTTCA TCAGGCACAA
 TGAATCCAAC AGCATCCTCT TCTTCGGCAG ATTTCTTCT CCTTAAGATG ATCGTTGCCA
 TGGCATTGCT GCTTTTAGCA AAAAACAACT ACCAGTGTAA CTCATATGAT TATGAAAATC
 40 GTCCATTCTT TTAAATGTTG TCTCACTTGC ATTTCCAGTC TTGCCATCA AATCAATGAT
 TTAATGACTC CAATAATGTG TGTGTTATA ACCATCCTCG AAAGTGAAT GTCCTTTTT
 TTGTGCCATG CGTAAGGTGA GTCAAACCAA ACCTCATTGA TAATCTCCCC TTTGGTTTCC
 45 TTTGAAAGTA AATTGGTATC TTGTAGTTT GTGCACACGA AAGGAGAGAA AGTTTCTCCA
 GTAAAGAGTA CGAACTAGTA ATTTGGGGG GTCTCTCTAA TTCTGGTATT TTGACATGTT
 50 ATAATACGCA AGTAAAATAA AACAAATAGTT TACTCAGCTC ATGTTACTAT TCCCCAACAG
 ATATTGTGGC AAATCACACA TAGGAAAGAG GATTTGGGAA TACAGTAGCA AAACATAAAAT
 TAAAACCTCAA ATGCCAGGA CAAAATAAAA CAATATACCA GATGGAGAGG ATGCCCGTAT
 55 TTTCATCTTC CATTCTAACAA TTATCCATTG TTAGATGCAT AAGCATTTCG ATATTGTGTA
 ATAAATGTGG TATTGAGAA GATAAAATGAT GTAGTTGATC AGTAATCCTC CTCTATCACC
 TTTTTAGACT TTGTAAGGTA AATATTTGGA CTAACTTTA GAAAAGTTTC CCTTTTTTC
 60 TCCATTACAA TTTTCTGGT TTTTTTTTT TTTTTTGAGT GAGGTACGAG TATTACCAA
 TGATATTTTC TGAAGATGCT TTTGGAAAG CTCTGAATCT ATACCTAATG CTCTTAATTA
 TTGGCTTGTGTT TCATTTTTT CCTCCAGTTT TTAACAAGAT CACATAACTG GCTTATTTT
 65 AACAGCTTTG TCAAAACTACA ATTTACATGC CGTAAAATGT ACACACTGTA ATTTTATAAT
 TCATTGACTT TTAGTAAATT TTCTAGCGTT ATGCATCGCC ACAATCCAGT TTTAGAATAT

TTCCATGACC CTAAGAAGTT TCCTCATGTC TATTAATATT CCCAATCCTA GGCACCACTG
 AGTTGTTTC TGTCTTTATA AGTTTTCTT TCTACATCTT ATATAAATGG AATCATAATA
 CATGTAGTAT TTTGTGTCTG GCGTCTTGCA CTTAGCATGG TGTTCTTGAG GTTCATCTGT
 TGTAGTATGT ATTGATACTT AGGATTTTT TATTGCCGAA TACTATTCCA TTGCATGGAA
 AAGACCTATT TTATTTCTAG GTTCACCAGT TGAGGGACAT TTGGATTGTT CCCACTTCTT
 GGGCTGTTAG GAATAATGTT GCTCTGAACA TGTAATAAAA GATCTTTGTG TTCAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAA

5

10

15

Tabelle 1

Aminosäurehomologie zwischen hurpin und bekannten Ovalbumin-Serpinen

Nr.	% Homologie zu hurpin	Serpin	swissprot Zugriffsnummer	Gensymbol
1.	59.1	Squamous cell carcinoma antigen 1	P29508	SCCA1/SCCA
2.	58.5	Squamous cell carcinoma antigen 2	P48594	SCCA2
3.	43.5	Bomapin	P48595	PI 10
4.	38.8	Gene Y Protein	P01014	Y
5.	38.0	Leukocyte elastase inhibitor (LEI/EI)	P30740	ELANH2/PI2
6.	36.7	Placental thrombin inhibitor	P35237	PI 6
7.	35.8	Cytoplasmic antiproteinase	P50453	PI 9 /CAP3
8.	35.1	Ovalbumin	P01012	-
9.	33.1	Plasminogen activator inhibitor-2	P05120	PAI-2
10.	32.3	Cytoplasmic antiproteinase 2	P50452	PI 8/CAP2
11.	27.3	Antithrombin-III precursor	P01008	AT3
12.	26.0	Maspin precursor	P36952	PI 5

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Eine Nukleinsäure, die die folgende Nukleotidsequenz enthält:

50

R7-1.1
 R7-16.1
 R7-12.2.

2. Nukleotidsequenz eines Gens oder Genfragments, welches in den folgenden Vektoren enthalten ist:

55

pBS-HP1.1
 pBS-HP16.1
 pBS-HP12.2.

3. Eine Nukleinsäure, die unter stringenten Bedingungen mit Nukleotidsequenzen aus Claim 1 und 2 oder der komplementären Sequenz hybridisiert.

60

4. Eine Aminosäuresequenz, für die die Sequenzen aus claim 1 kodieren.

5. Einen Vektor, der die Sequenzen aus claim 1, 2 oder 3 enthält.

6. Einen Expressionsvektor, der die Nukleotidsequenz aus claim 1, 2 oder 3 in funktioneller Assoziation mit regulatorischen Elementen zur Kontrolle der Expression der Nukleotidsequenz in einer Wirtszelle enthält.

65

7. Eine gentechnisch hergestellte Wirtszelle, die die Nukleotidsequenz aus claim 1, 2, 3 oder 4 enthält.

8. Eine gentechnisch hergestellte Wirtszelle, die die Nukleotidsequenz aus claim 1, 2, 3 oder 4 in funktioneller As-

soziation mit regulatorischen Elementen zur Kontrolle der Expression der Nukleotidsequenz in der Wirtszelle enthält.

9. Ein gereinigtes Genprodukt, das durch die Nukleinsäuren in claim 1, 2, 3 oder 4 kodiert wird.

10. Einen Antikörper, der immunspezifisch das Genprodukt aus claim 8 bindet.

5 11. Ein transgenes Tier, in dem die Nukleinsäuren aus claim 1, 2, 3 oder 4 als exprimiertes Transgen einen Bestandteil des Genoms des Tieres bildet.

12. Ein transgenes Tier, in dem die Expression einer genomischen Sequenz, welche das Genprodukt von claim 8 kodiert, verhindert oder unterdrückt wird.

10

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

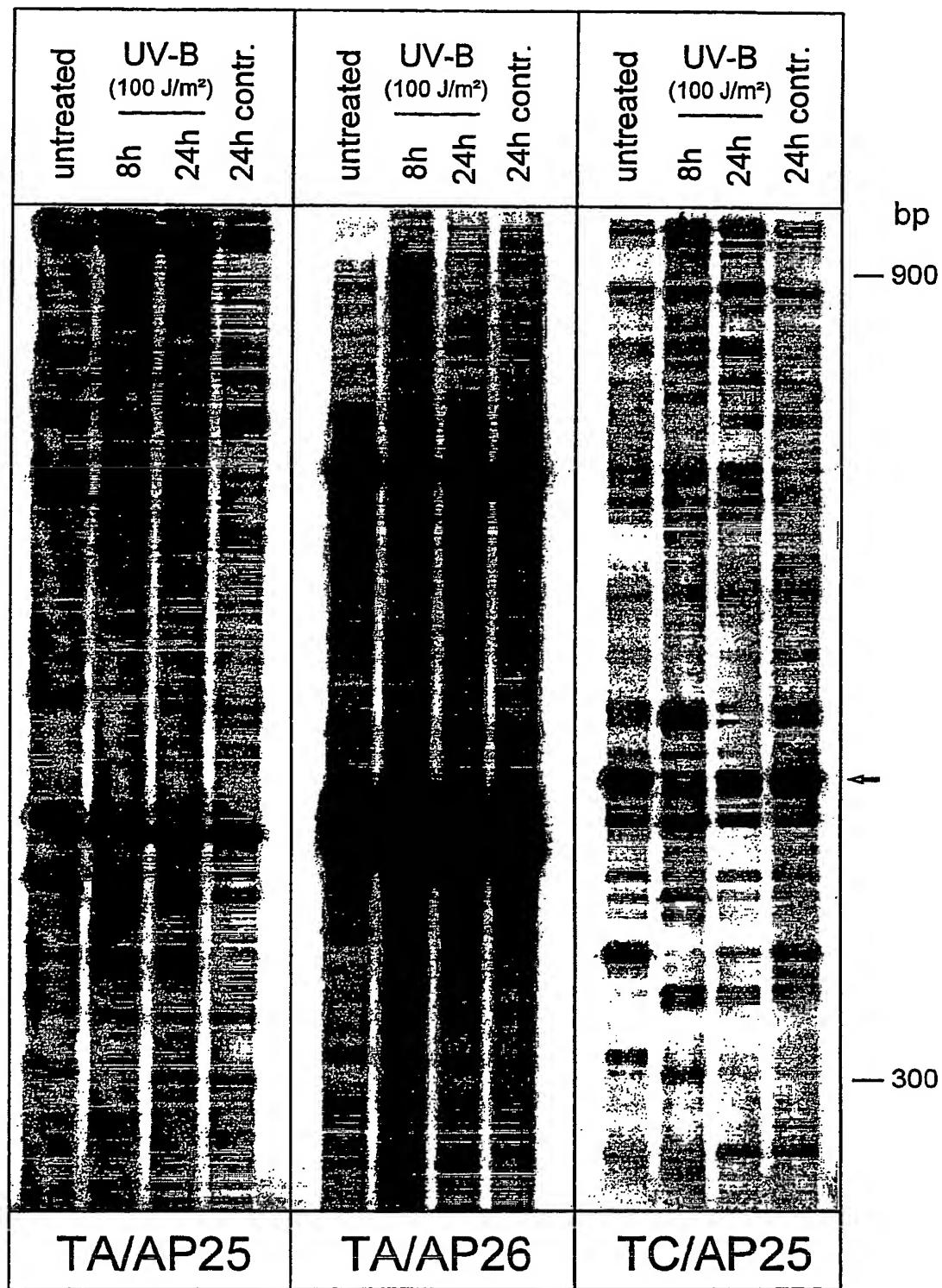


Abb. 1

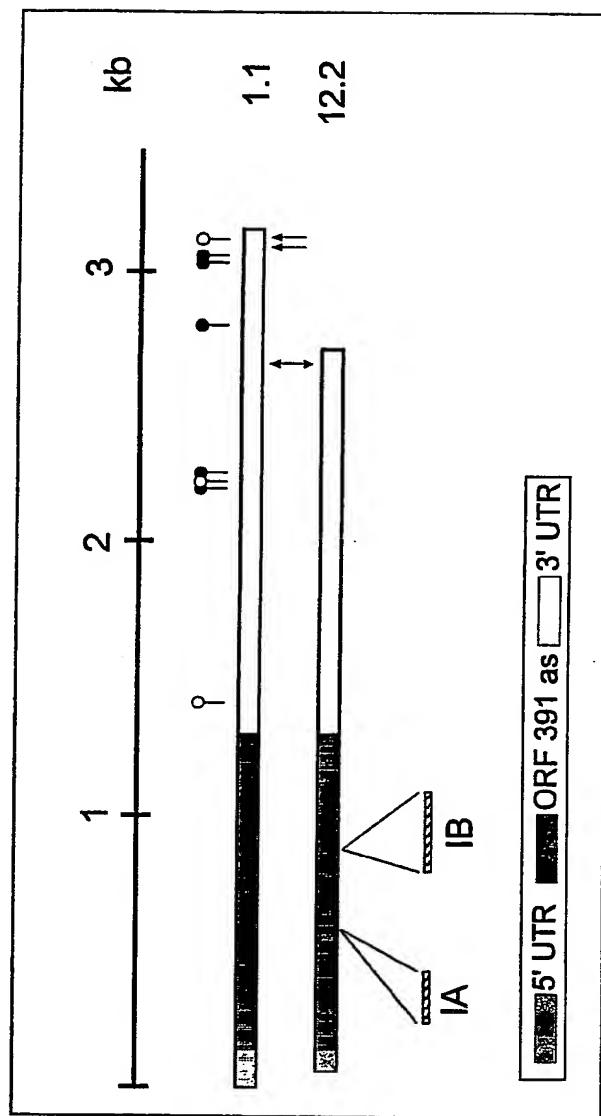


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation der *hurpin* cDNA-Klone. Die unterschiedlich schattierten Balken (siehe Legende) repräsentieren den 5' untranslatierten Bereich (5' UTR), den offenen Leserahmen (ORF) sowie den 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) der cDNA-Klone. Die Position und Größe von zwei möglichen Intron-Sequenzen (IA, IB) ist ebenfalls angegeben. Die Position verschiedener "rapid degradation"-Motive im 3' UTR sind durch Pfeile (A_nT_nA) markiert. Die Pfeile bezeichnen die Lage der identifizierten Polyadenylierungssignale.

Abb. 2

hurpin	1	M D S L G A V S T R L G F D L F K E L K K T N D G N I F F S P V G I L T	36
SCCA2	1	M N S L S E A N T K F M F D L F Q Q F R K S K E N N I F Y S P I S I T S	36
SCCA1	1	M N S L S E A N T K F M F D L F Q Q F R K S K E N N I F Y S P I S I T S	36
hurpin	37	A I G M V L L G T R G A T A S Q L E E V I F H S E K E T K S S R I K A E E	72
SCCA2	37	A L G M V L L G A K D N T A Q Q I S K V L H F D Q V T E N T T E K A A T	72
SCCA1	37	A L G M V L L G A K D N T A Q Q I K K V L H F D Q V T E N T T G K A A T	72
hurpin	73	K E V I E N T E A V H Q Q F Q K F L T E I S K L T N D Y E L N I T N R L	108
SCCA2	73	Y H V D R - S G N V H H Q F Q K L L T E F N K S T D A Y E L K I A N K L	107
SCCA1	73	Y H V D R - S G N V H H Q F Q K L L T E F N K S T D A Y E L K I A N K L	107
hurpin	109	F G E K T Y L F L Q K Y L D Y V E K Y Y H A S L E P V D F V N A A D E S	144
SCCA2	108	F G E K T Y Q F L Q E Y L D A I K K F Y Q T S V E S T D F A N A P E E S	143
SCCA1	108	F G E K T Y L F L Q E Y L D A I K K F Y Q T S V E S V D F A N A P E E S	143
hurpin	145	R K K I N S W V E S K T N E K I K D L F P D G S I S S S T K L V L V N M	180
SCCA2	144	R K K I N S W V E S Q T N E K I K N L F P D G T I G N D T T L V L V N A	179
SCCA1	144	R K K I N S W V E S Q T N E K I K N L I P E G N I G S N T T L V L V N A	179
hurpin	181	V Y F K G Q W D R E F K K E N T K E E K F W M N K S T S K S V Q M M T Q	216
SCCA2	180	I Y F K G Q W E N K F K K E N T K E E K F W P N K N T Y K S V Q M M R Q	215
SCCA1	180	I Y F K G Q W E K K F N K E D T K E E K F W P N K N T Y K S I Q M M R Q	215
hurpin	217	S H S F S F T F L E D L Q A K I L G I P Y K N N D L S M E V L L P N D I	252
SCCA2	216	Y N S F N F A L L E D V Q A K V L E I P Y K G K D L S M I V L L P N E I	251
SCCA1	216	Y T S F H F A S L E D V Q A K V L E I P Y K G K D L S M I V L L P N E I	251
hurpin	253	D G L E K I I D K I S P E K L V E W T S P G H M E E R K V N L H L P R F	288
SCCA2	252	D G L Q K L E E K L T A E K L M E W T S L Q N M R E T C V D L H L P R F	287
SCCA1	252	D G L Q K L E E K L T A E K L M E W T S L Q N M R E T R V D L H L P R F	287
hurpin	289	E V E D G Y D L Q A V L A A M G M G D A F S E H K A D Y S G M S S G S G	324
SCCA2	288	K M E E S Y D L K D T L R T M G M V N I F N G - D A D L S G M T W S H G	322
SCCA1	288	K V E E S Y D L K D T L R T M G M V D I F N G - D A D L S G M T G S R G	322
hurpin	325	L Y A Q K E L H S S F V A V T E E G T E A A A A T G I G F T V T S A P G	359
SCCA2	323	L S V S K V L H K A F V E V T E E G V E A A A A T A V V V V E L S S P S	358
SCCA1	323	L V L S G V L H K A F V E V T E E G A E A A A A T A V V G F G S S P T S	358
hurpin	360	H - E N V H C N H P F L F F I R H N E S N S I L F F G R F S S P	391
SCCA2	359	T N E E F G C N H P F L F F I R Q N K T N S I L F Y G R F S S P	390
SCCA1	359	T N E E F H C N H P F L F F I R Q N K T N S I L F Y G R F S S P	390

466.3.

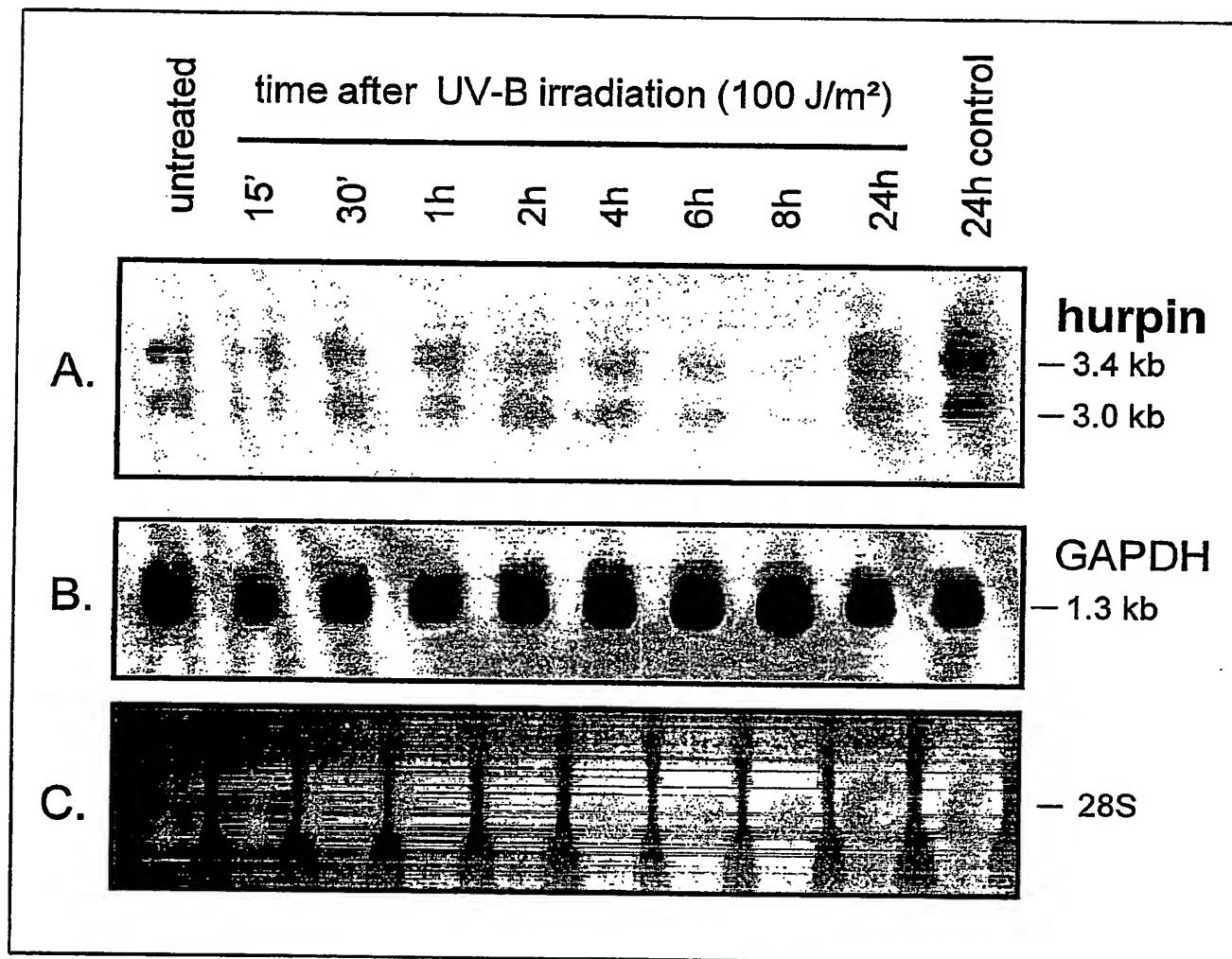


Abb. 4

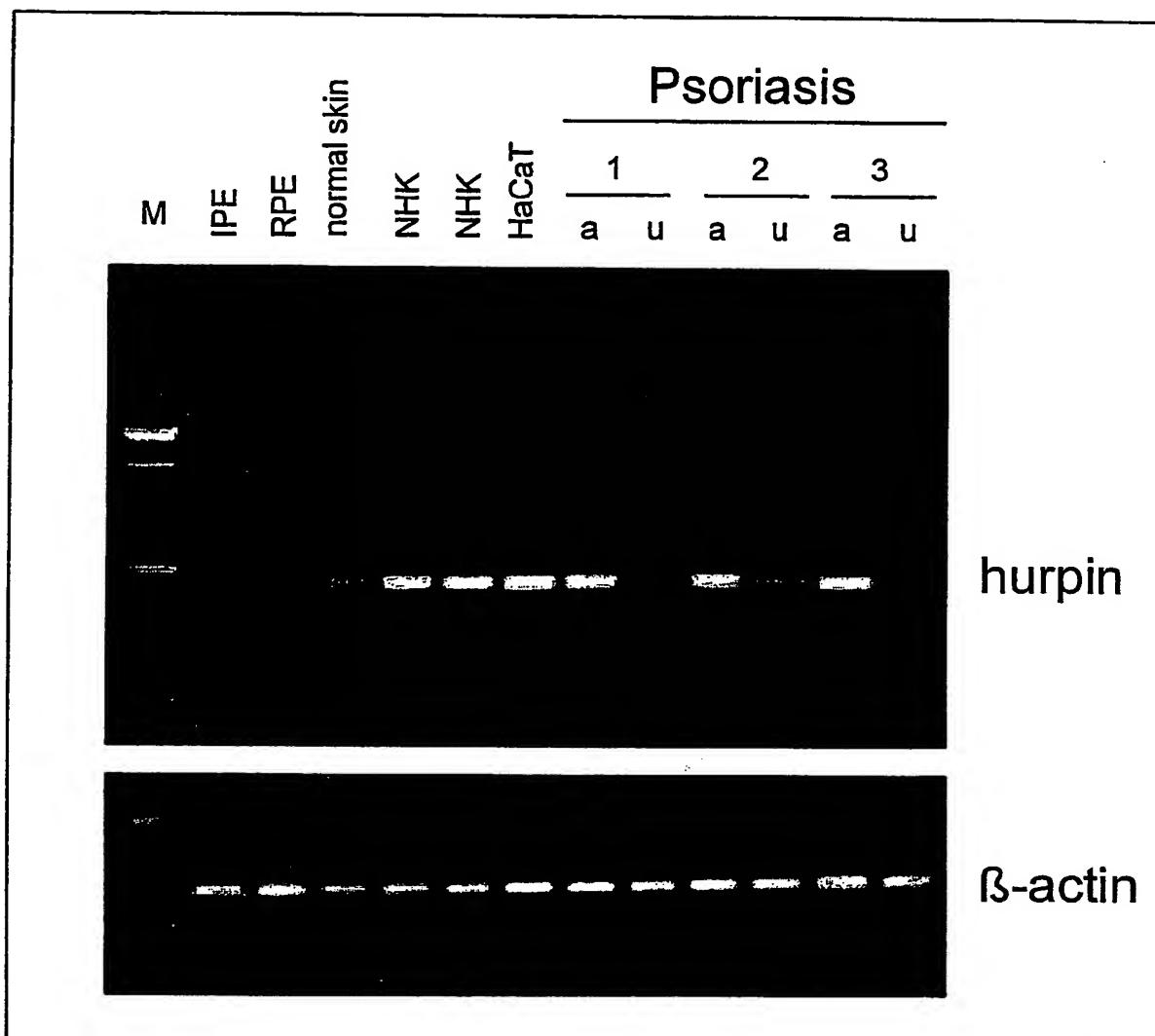
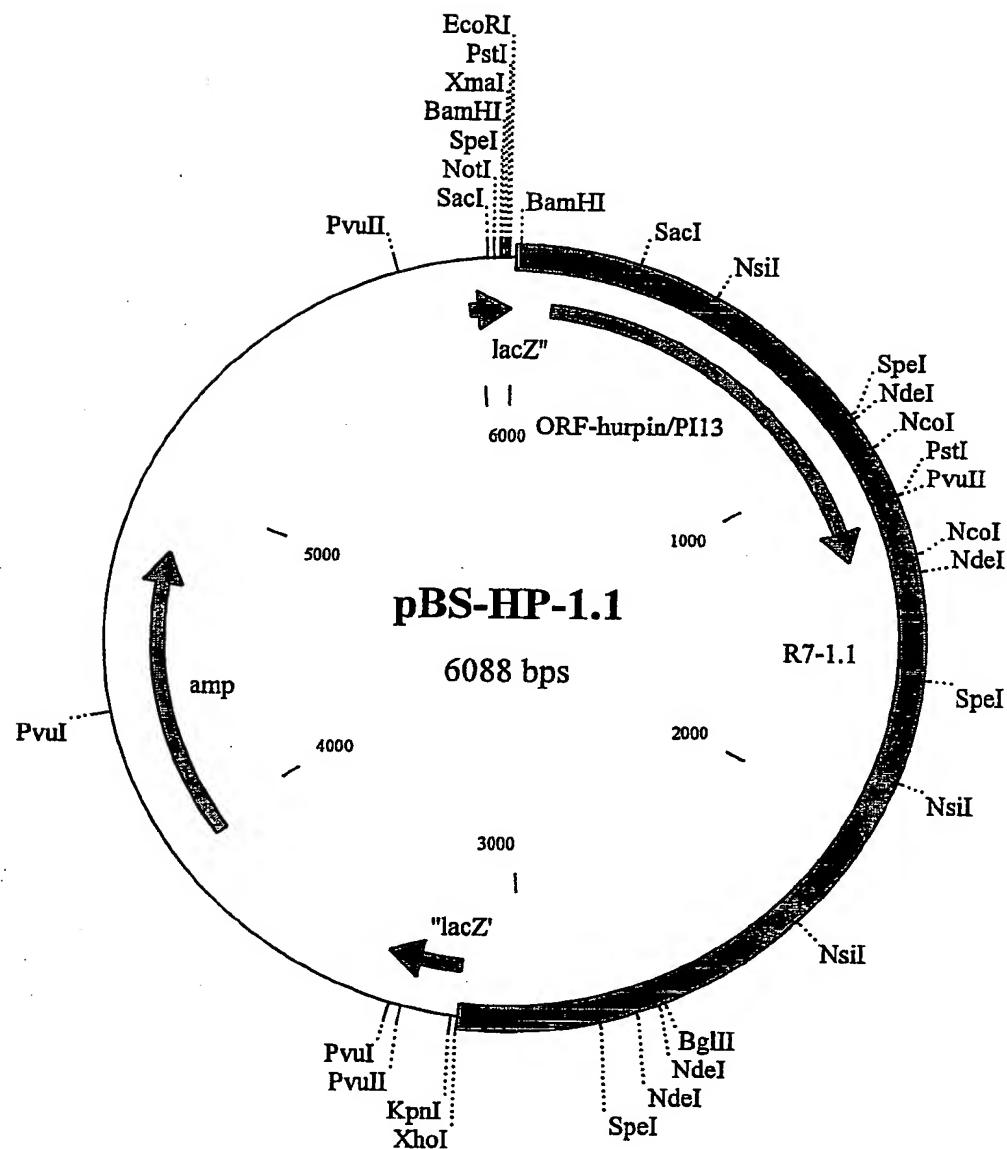


Abb. 5



756.6

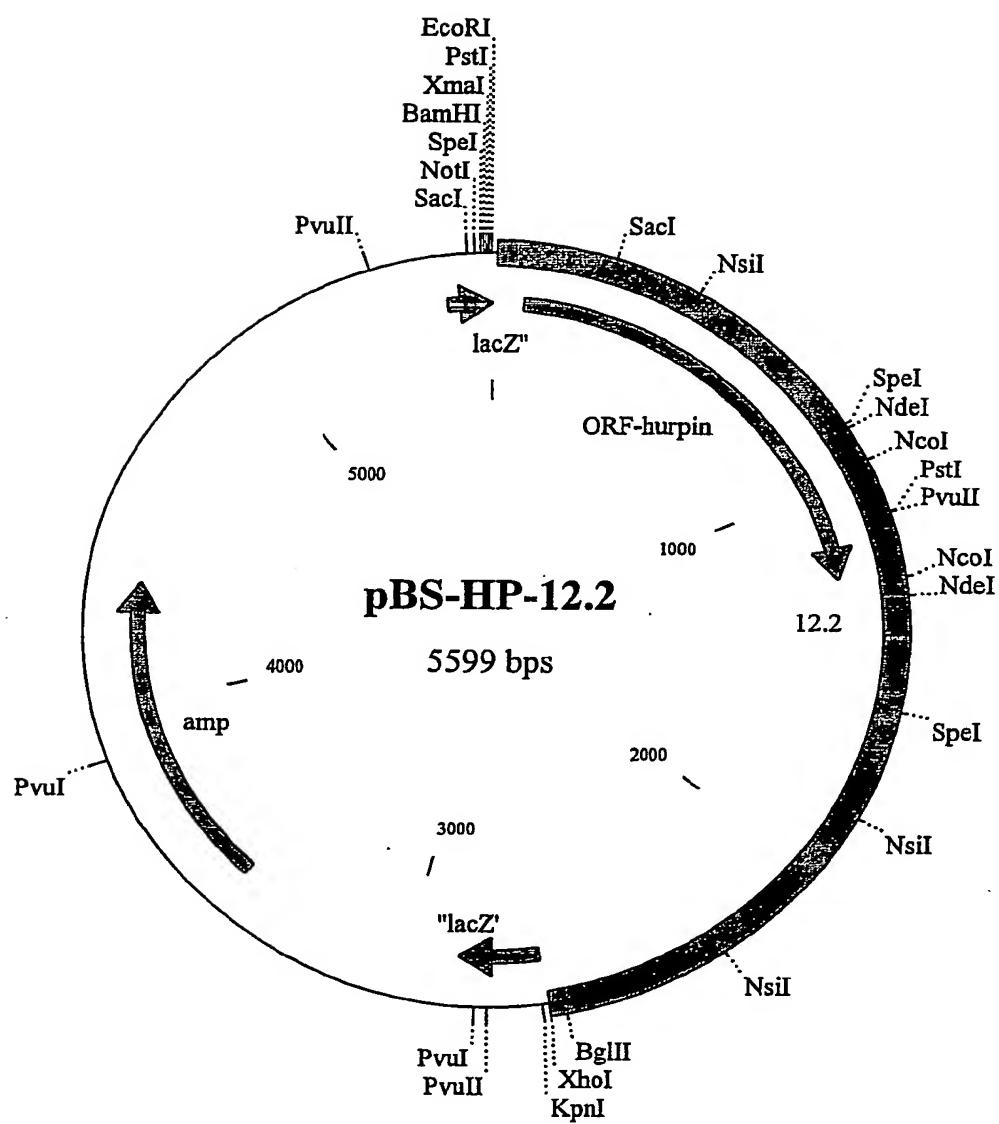


Abb. 7

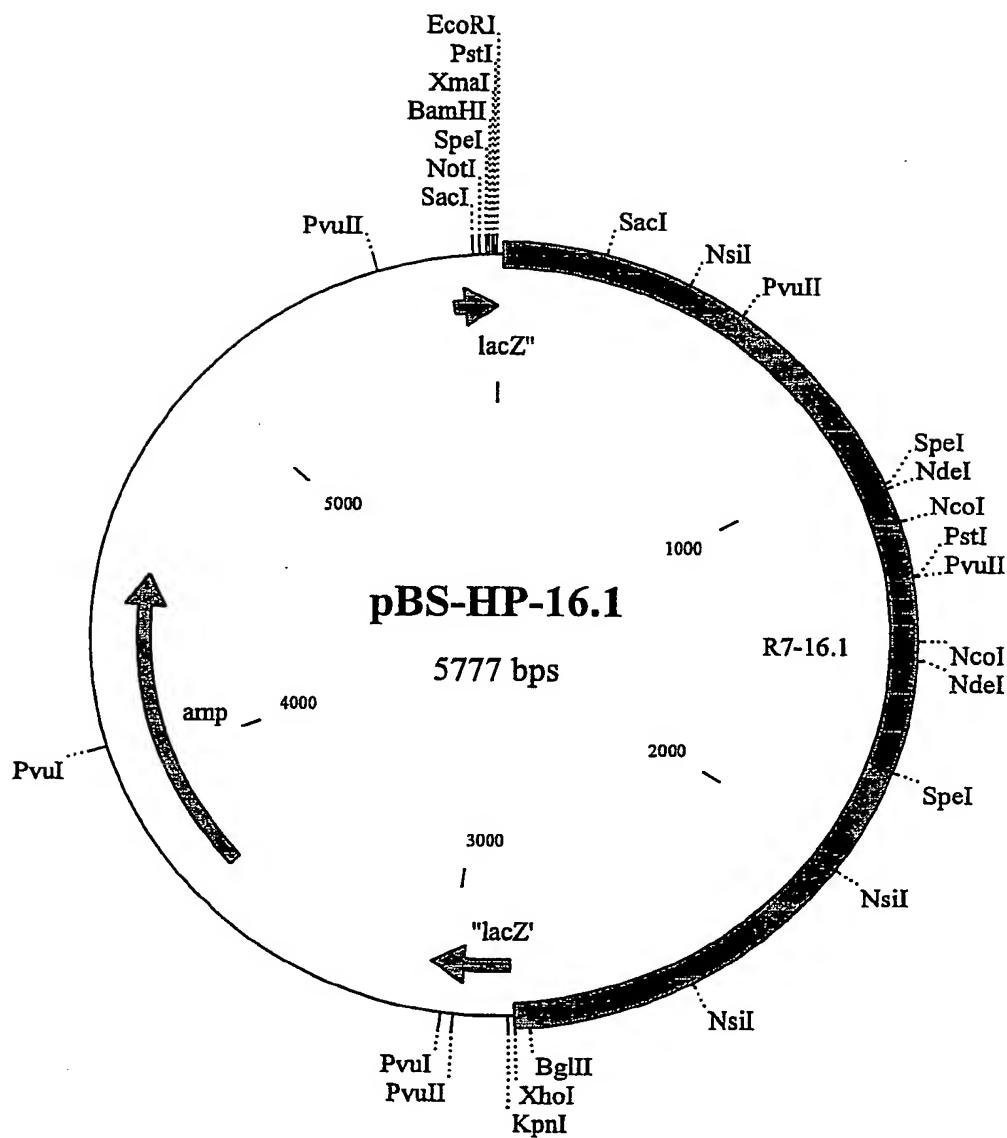


Abb. 8